

論文要旨等報告書

氏	兒 玉 直 紀
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 5 8 6 号
学位授与の日付	平成 2 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Purinergic modulation of area postrema neuronal excitability in rat brain slices. (ラット脳スライス標本における最後野ニューロンのプリン受容体を介する興奮性の修飾)
論文審査委員	教授 杉本 朋貞 教授 松尾 龍二 准教授 松香 芳三

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年, ATP は中枢神経系の神経伝達物質として知られ, 自律神経系の神経制御に関与するとされる。延髄最後野は嘔吐など口腔の自律機能制御に関与するが, ATP との関連は全く報告されていない。すなわち, 延髄最後野において P2X 受容体の存在が免疫組織化学的手法により同定されているものの, 神経活動については未だ不明である。そこで本研究は, プリン受容体を介する最後野ニューロン活動の修飾機序を解明することを目的とした。

【材料と方法】

新鮮脳スライス標本の作製

SD系幼若ラット(7~21 日齢)をハロセン麻酔下にて断頭し脳を摘出, 氷冷した蔗糖リンゲル液[(mM) 234 sucrose, 2.5 KCl, 0.5 CaCl₂, 10 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucose(95%O₂-5%CO₂にてバブリングを行い pH7.3 に調整)]中に約 1 分間浸した後, マイクロスライサーを用いて厚さ約 150~200 μ m の最後野を含む前額断スライス標本を作製した。これを室温(約 24℃)の人工脳脊髄液(ASCF) [(mM) 124 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1.6 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose, (95%O₂-5%CO₂にてバブリングを行い pH7.3 に調整)]中で少なくとも 1 時間培養した後, 人工灌流装置に固定した。

神経活動の記録

顕微鏡下で最後野ニューロンを同定し, パッチクランプ法を用いて, 膜電流(TTX 存在下)および膜電位を計測した。ATP とそのアナログ($\alpha\beta$ me-ATP, β yme-ATP), PPADS (P2X 受容体阻害薬), CNQX (AMPA 受容体阻害薬)を灌流液中に投与した。得られたデータはアナログ・デジタル変換してコンピューターで収集し, ハードディスクおよびデジタルテープレコーダーに保存した。その後, オフラインにてデータ解析プログラム(p-CLAMP6 と MiniAnalysis)を用いて解析した。

【結果】

最後野ニューロンの約 62% (66/106) が ATP に対して感受性を示し、また ATP に感受性を示した 66 例のうち大部分 (63/66) は興奮性応答を示した。興奮性応答を示すニューロンは H 電流 (過分極作動性カチオン電流) の有るものとなっていたが、抑制性の応答を示すニューロンは H 電流がないもののみであった (n=3)。

最後野における ATP の作用機序

voltage-clamp 法を用いて ATP に対する反応を調べた結果、最後野ニューロンは 1) 著明な内向き電流誘発 (n=26), 2) 持続的な膜電流変化は少なく、微小シナプス後電流 (mEPSC) の頻度の増加 (n=24), 3) 著明な外向き電流誘発 (n=1), を示した。CNQX 存在下では内向き電流に影響せず、自発性の mEPSC および ATP によって誘発される mEPSC の増加は観察されなかった。以上より、最後野ニューロンには ATP によって 1) シナプス後細胞の膜電位を直接脱分極させる機序, 2) 神経終末部に作用してグルタミン酸放出を増加させる機序, があることがわかった。

最後野におけるプリン受容体のサブタイプの同定

ATP により誘発される内向き電流は $\alpha\beta$ me-ATP 投与では発生せず、PPADS 存在下では消失した。よって、シナプス後細胞上には $P2X_7$ 受容体と $P2X_2$ および $P2X_5$ サブユニットにより構成される受容体が存在することがわかった。

$\alpha\beta$ me-ATP の濃度増加により mEPSC の頻度増加が約半数のニューロンにおいて観察された。PPADS 存在下では上記応答は完全に阻害された。さらに、 $\alpha\beta$ me-ATP に応答を示すニューロンにおいて β me-ATP を投与しても同様の結果であった。以上より、シナプス前終末にはシナプス後細胞上と同じサブユニットにより構成される受容体、ならびに $P2X_1$ サブユニットにより構成される受容体が半数ずつ存在することがわかった。

ATP が最後野ニューロンの自発発火に及ぼす影響

current-clamp 法を用いて ATP に対する反応を調べた結果、最後野ニューロンは 1) 脱分極 (n=13), 2) 過分極 (n=2) を示した。さらに、興奮性のニューロンにおいては脱分極とともに活動電位の自発発火の頻度を増大させること、抑制性のニューロンにおいて過分極させると共に活動電位の発生を抑制すること、がわかった。

【考察】

細胞外 ATP 濃度の増加により、大部分の最後野ニューロンは興奮性応答を示し、これには、シナプス後細胞の膜電位を直接脱分極させる機序、および神経終末部に作用してグルタミン酸放出を増加させる機序があることが明らかとなった。また、シナプス後細胞上に $P2X_7$ 受容体と $P2X_2$ および $P2X_5$ サブユニットにより構成される受容体が存在すること、神経終末部の受容体では約半数がシナプス後細胞上と同じサブユニットをもち、残り半数には $P2X_1$ サブユニットも含まれていること、がわかった。

論文審査結果の要旨

本学位申請論文は、延髄最後野ニューロンのプリン受容体の機能を電気生理学的に解析したものである。実験ではラットの最後野を含む脳スライス標本を作成し、ホールセルパッチクランプ法により膜電流と膜電位を計測している。この実験系を用いて、1) 細胞外液に投与した ATP はシナプス後細胞の膜電位を直接脱分極（一部は過分極）させる機序があり、またシナプス前神経終末部に作用してグルタミン酸放出を増加させる機序があることを示した。2) ATP のアナログに対する感受性から、シナプス後細胞上には $P2X_7$ 受容体と $P2X_2$ および $P2X_5$ サブユニットにより構成される受容体が存在すること、およびシナプス前終末にはシナプス後細胞上と同じサブユニットにより構成される受容体と $P2X_1$ サブユニットにより構成される受容体が存在することを示した。3) ATP は興奮性のニューロンにおいては脱分極を起こすと共に活動電位の自発発火の頻度を増大させ、抑制性のニューロンにおいては過分極させると共に活動電位の発生を抑制することを示した。

ATP は中枢神経系の神経伝達物質として知られ、近年の研究では自律神経系の神経制御に関与するとされる。延髄最後野は嘔吐などの自律神経機能に関与するが、ATP との関連は全く報告されていなかった。本研究は延髄最後野において、プリン受容体を介する活動の修飾機序が存在すること解明しており、摂食行動の神経機構を知る上で重要な研究と位置付けられる。

よって、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。